

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

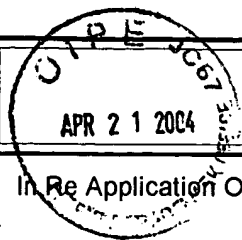
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



TRANSMITTAL LETTER
(General - Patent Pending)

Docket No.
2877

In Re Application Of: **OBENDORF, M., ET AL**

Serial No.
10/791,017

Filing Date
03/02/2004

Examiner

Group Art Unit

Title: **METHOD FOR DETERMINING HORMONAL EFFECT OF SUBSTANCES**

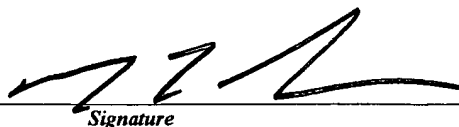
TO THE COMMISSIONER FOR PATENTS:

Transmitted herewith is:

CERTIFIED COPY OF THE PRIORITY DOCUMENT 103 09 280.3

in the above identified application.

- ☒ No additional fee is required.
- ☐ A check in the amount of _____ is attached.
- ☐ The Director is hereby authorized to charge and credit Deposit Account No. _____ as described below.
- ☐ Charge the amount of _____
- ☐ Credit any overpayment.
- ☐ Charge any additional fee required.


Signature

Dated: **APRIL 19, 2004**

I certify that this document and fee is being deposited on
APRIL 19, 2004 with the U.S. Postal Service as first
class mail under 37 C.F.R. 1.8 and is addressed to the
Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA
22313-1450.


Signature of Person Mailing Correspondence

MICHAEL J. STRIKER

Typed or Printed Name of Person Mailing Correspondence

CC:

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 09 280.3

Anmeldetag: 04. März 2003

Anmelder/Inhaber: Jenapharm GmbH & Co KG,
07745 Jena/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Bestimmung des hormonellen
Effekts von Substanzen

IPC: C 12 Q 1/25

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Klostermeyer

5

Anwaltsakte: Pat 3684/11

4. März 2003
H/18/jb(sb)kt

10

JENAPHARM GmbH & Co. KG

Otto-Schott-Straße 15

D-07745 Jena

15

Verfahren zur Bestimmung des hormonellen Effekts von Substanzen

20

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des hormonellen Effektes von Substanzen sowie ein Verfahren zur Bestimmung von Störungen im Co-Modulationsmechanismus nukleärer Rezeptoren (NR). Darüberhinaus bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung von Ewing Sarcoma Protein (EWS) oder von EWS Derivaten sowie von Nukleinsäuren, welche dafür kodieren.

25

Bei der Beurteilung von Substanzen für eine mögliche pharmazeutische Anwendung ist es allgemein üblich, diese Substanzen auf eine eventuelle hormonelle Wirkung, insbesondere auf eine möglicherweise vorhandene androgene oder antiandrogene Aktivität, zu prüfen. Bei der Verabreichung pharmakologisch wirksamer Substanzen sind Kenntnisse über deren hormonelle Effekte, insbesondere androgene oder antiandrogene Effekte, zur Beurteilung etwaiger Nebenwirkungen, wichtig. Zur Prüfung der hormonellen Wirkung von Substanzen kommen beispielsweise Verfahren zum Einsatz, bei denen die Fähigkeit der Substanzen gemessen wird, an die Hormonrezeptoren zu binden und deren Transkriptionsaktivität zu aktivieren.

30

35

Kenntnisse über hormonelle Effekte von Substanzen sind aber nicht nur bei potentiellen Pharmaka von Interesse, sondern auch bei nicht-pharmazeutischen Substanzen, da von vielen, in der Umwelt vorhandenen Substanzen angenommen wird, dass sie bei Teilen der Bevölkerung eine androgene oder antiandrogene bzw. estrogene oder antiestrogene Aktivität aufweisen können. Möglicherweise wird dadurch eine unerwünschte, schädliche Wirkung hervorgerufen.

40

Eine besondere Schwierigkeit liegt in der Identifizierung und Charakterisierung von Effekten auf die von Steroidhormonen vermittelten Wirkungen, da die Signalkaskaden und –Netzwerke, die letztlich die hormonvermittelte Transkriptionsregulation steuern, hier besonders komplex ausgestaltet sind. Der Grund dafür liegt in der sehr ähnlichen Ausgestaltung der DNA-Zielsequenzen, an welche die verschiedenen Steroidhormonrezeptoren nach Ligandenaktivierung binden. Diese bedingt, dass die nukleären Rezeptoren zur Auslösung einer gezielten Antwort auf die Interaktion mit speziellen Co-Faktoren angewiesen sind, die unter anderem die Spezifität der rezeptorvermittelten Transkriptionsaktivierung verstärken.

Zur Identifizierung von Substanzen, welche auf bestimmte hormoninduzierte Signalwege einwirken, sind daher Testsysteme und –Verfahren notwendig, die gezielt die Funktion einzelner Komponenten des zellulären Signalnetzwerkes zur Vermittlung steroidaler Effekte erfassen können.

Es besteht somit ein Bedarf an einem Verfahren, mit dem in zuverlässiger, empfindlicher, einfacher, kostengünstiger und schneller Weise eine Aussage über den hormonellen Effekt von Substanzen getroffen werden kann. Die bisher bekannten Verfahren genügen dem nicht.

Der vorliegenden Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem in zuverlässiger, empfindlicher, einfacher, kostengünstiger und schneller Weise eine Aussage über den hormonellen Effekt der zu testenden Substanzen getroffen werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung des hormonellen Effektes von Substanzen mit den Schritten Kontaktieren von Ewing Sarcoma Protein (EWS) oder einem Derivat davon mit einem NR (nukleären Rezeptor) oder einem Derivat davon und einer Testsubstanz, und

- a. Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Bindung von EWS oder dessen Derivat und NR oder dessen Derivat, oder
- b. Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Liganden-induzierte Aktivität von NR.

Als Derivat eines Proteins bzw. Polypeptids wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jede, z.B. durch Aminosäure-Deletion, Substitution, Insertion, Inversion, Addition oder Austausch erhaltene Variante des Proteins bzw. Polypeptids verstanden. Hierbei sind solche Derivate bevorzugt, die die Fähigkeit des unveränderten Proteins/Polypeptides,

z.B. die Aktivität anderer Proteine zu beeinflussen oder diese zumindest zu binden, behalten haben (funktionelle Derivate).

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass das Ewing Sarkom Protein sowie davon abgeleitete Derivate (im folgenden als EWS bezeichnet) die Fähigkeit haben, mit nukleären Rezeptoren (bzw. Derivaten derselben) zu interagieren und deren Aktivität zu modulieren.

Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NRs), zu der mehr als 50 verschiedene Proteine gehören, ist eine Gruppe verwandter Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des jeweiligen Zielgens als Reaktion auf spezifische Liganden, z. B. Hormone, steuern. Die Familie kann nach bestimmten Charakteristika, wie z.B. Dimerisationsstatus, Art des Liganden oder Struktur des DNA-Reaktionselements, in mehrere Subfamilien unterteilt werden (Beato et al., 2000, Human Reproduct. Update, 6, 225-236). Charakteristisches Merkmal der NRs ist die übereinstimmende Struktur der funktionellen Domäne (mit den Bezeichnungen A bis F) mit einer stark variablen, nur schwach konservierten N-terminalen Region mit autonomer konstitutiver Aktivierungsfunktion (AF-1), einer stark konservierten DNA-Bindungsdomäne (DBD), die für die Erkennung von speziellen DNA-Reaktionselementen verantwortlich ist und aus zwei Zinkfinger-Motiven besteht, einer variablen Scharnierdomäne und einer konservierten multifunktionalen C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD) mit Dimerisations- und Liganden-abhängiger Transaktivierungsfunktion (AF-2). Im Anschluss daran folgt die am weitesten C-terminal gelegene Region, deren Funktion nicht bekannt ist und die bei Rezeptoren wie z.B. PR (Progesteron-Rezeptor), PPAR (Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor) und RXR (Retinoid-X-Rezeptor) fehlt (Mangelsdorf & Evans, 1995; Cell, 83, 841-850; Robyr et al., 2000, Mol. Endocrinol., 14, 329-347). Für einige NRs (z.B. den Androgen-Rezeptor (AR)) wurde nachgewiesen, dass die N-terminale Region in der Lage ist, mit der C-terminalen Region zu interagieren (Brinkmann et al., 1999, J. Steroid Biochem. and Mol. Biol., 69, 307-313). Steroidhormonrezeptoren wie z.B. Estrogen- (ER), Progesteron- (PR), Glukokortikoid- (GR), Mineralokortikoid- (MR) und Androgenrezeptoren (AR) binden steroidale Liganden, die sich von Pregnenolon ableiten, wie die Progestine, die Estrogene, die Glukokortikoide und die Mineralokortikoide, sowie Androgene. Die Ligandenbindung aktiviert den Rezeptor und steuert die Expression entsprechender Zielgene.

EWS ist bekannt als Proto-Onkogen des Ewing-Sarkoms und anderer Neoplasien wie z.B. der Klarzellsarkome von Sehnen und Aponeurosen, der klein- und rundzelligen desmoplastischen Intraabdominaltumoren sowie der extraskeletalen Chondrosarkome (Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G., Aurias, A., and Thomas, G., 1992, Nature 359: 162-165, Zucman, J., Delattre, O., Desmaze, C., Epstein, A. L., Stenman, G., Speleman, F.,

Fletchers, C.D., Aurias, A., and Thomas, G; 1993, Nature Genet. 4: 341-345, Gerald, W. L., Rosai, J. and Ladanyi, M., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1028-1032, Laballe, Y., Zucman, J., Stenman, G., Kindblom, L.G., Knight, J., Turc-Carel, C., Dockhorn-Dworniszak, B., Mandahl, N., Desmaze, C., Peter, M., Aurias, A., Delattre, O., and Thomas, G., 1995, Hum. Mol. Genet. 4: 2219-2226). Bei all diesen Tumoren wird der EWS-Genlocus umarrangiert, so dass das Aminosäuren-Ende (N-Terminus) des Proteins mit einer DNA-Bindungsdomäne von FLI1, ERG1, ATF1 oder WT1 verschmilzt. Dieses N-terminale Ende des fusionierenden Proteins enthält die EWS-Exone 1-7 oder 1-8 oder 1-9. Liegt die Bruchstelle zwischen Exon 7 und Exon 8, weist der EWS-Anteil des durch die Fusion entstandenen Proteins keine Übereinstimmungen mit der hier definierten Androgenrezeptorbindungsdomäne auf. Liegt dagegen die Bruchstelle zwischen den Exonen 8 und 9 oder 9 und 10, stimmen nur 5 bzw. 20 Aminosäuren der beiden onkogenen EWS-Fusionsproteine mit dem EWS-Anteil überein, der die Androgenrezeptorbindungsdomäne enthält. Daraus ist zu schließen, dass die umarrangierten EWS-Fusionsproteine die Fähigkeit zur Bindung an Androgenrezeptoren verloren haben.

Bei der Analyse von Thymus-RNA mittels RT-PCR wurde eine EWS-Variante (EWS1-c), bei der 17 Aminosäuren fehlten (Abbildung 3), gefunden. Offensichtlich handelt es sich hierbei um eine Splice-Variante, da alle notwendigen Konsensus-Sequenzen an den Nahtstellen zwischen Intronen und Exonen vorhanden waren. Das Ergebnis war eine Verkürzung von Exon 15 (Exon 15b). Im Stand der Technik sind darüber hinaus weitere Splice-Varianten bekannt. Eine (Ohno, T., Ouchida, M., Lee, L., Gatalica, Z., Rao, V.N., and Reddy, E.S., 1994, Oncogene 9: 3087-3097) stellt ein um 200 bp verkürztes EWS-Transkript (EWS1-b) dar und wurde in ruhenden oder durch Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten Lymphozyten gefunden. Dem EWS1-b fehlen die Exone 8 und 9. Eine andere Variante (Melot, T., Dauphinot, L., Sevenet, N., Radvanyi, F., Delattre, O. (2001), Eur. J. Biochem. 268, 3483-3489) enthält ein zusätzliches Exon 4' zwischen den Exonen 4 und 5 und ist als gehirnspezifische Isoform bezeichnet.

EWS gehört zu einer Gruppe RNA-bindender Proteine, denen im Stand der Technik eine Implikation in Prozesse der RNA-Synthese bzw. -Prozessierung zugeschrieben wird, daneben war über die physiologische Funktion von somatischem wildtyp EWS bislang jedoch nur wenig bekannt. Insbesondere war im Stand der Technik nicht bekannt, dass EWS die Fähigkeit besitzt, nukleäre Rezeptoren zu binden und deren Aktivität zu modulieren, wodurch es der Klasse der NR-Co-Modulatoren zuzuordnen ist.

Ein *E.coli* Stamm mit der Bezeichnung *Escherichia Coli* EWS-10 CMX wurde unter der Nr. DSM 15417 am 24. Januar 2003 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegt. *Escherichia Coli* EWS-10 CMX enthält

die full length-EWS-cDNA, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann.

Die sog. Co-Modulatoren sind eine Klasse von Proteinen, die bei der Aktivierung (Co-Aktivatoren) bzw. Repression (Co-Repressoren) der Gentranskription als Brückenmoleküle zwischen dem Transkriptionsinitiationskomplex und den NRs dienen (McKenna et al., 1999, Endocr. Rev., 20, 321-347). Ein Co-Aktivator muss fähig sein, die Rezeptorfunktion zu verstärken und in Anwesenheit eines Agonisten mit der Aktivierungsdomäne von NRs direkt zu interagieren. Er muss auch mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren, und schließlich darf er nicht selbst die basale Transkriptionsaktivität verstärken. Die meisten Co-Modulatoren interagieren mit Hilfe eines oder mehrerer LXXLL-Motiv(en) (NR-Boxes) mit der AF-2-Domäne von NRs, jedoch wurden auch einige Co-Modulatoren beschrieben, die mit anderen NR-Regionen interagieren (Ding et al., 1998, Mol. Endocrinol., 12, 302-313). Ferner wurden viele Co-Modulatoren identifiziert, die in ähnlicher Weise mit mehreren verschiedenen NRs interagieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl *in vitro* (also z.B. als rein biochemischer oder biophysikalischer Assay, in Lösung oder in geeigneten soliden Matrices, etc.) als auch teilweise oder gänzlich im zellulären System ablaufen. Dem Fachmann sind solche unterschiedlichen Testsysteme hinlänglich bekannt.

Vorzugsweise läuft mindestens einer der Verfahrensschritte im zellulären System ab, da die Effekte der steroidvermittelten Transkriptionsaktivierung im physiologischen Kontext der Zelle besonders gut darstellbar sind. Demzufolge eignen sich für die Erfindung insbesondere eukaryontische Zellen, wobei sowohl primäre Zellen als auch etablierte Zelllinien zum Einsatz kommen können. Die Verwendung etablierter Zelllinien erlaubt eine besonders gute Reproduzierbarkeit und Kostengünstigkeit, die Verwendung primärer Zellen vermeidet dagegen weitgehend durch Mutation und klonale Selektion bedingte Zellkultur-Artefakte. Besonders geeignet sind Prostatazellen, Nervenzellen, Gliazellen, Fibroblasten, Blutzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Hepatozyten, Epithelzellen oder Muskelzellen.

Der hier bestimmte (d.h. identifizierte, quantifizierte oder charakterisierte) hormonelle Effekt kann sowohl aktivatorischer als auch inhibitorischer Natur sein und neben der Einwirkung auf die Rezeptor-Co-Modulator-Bindung auch jeden anderen Schritt der NR-Aktion beziehen, z.B. die Liganden-induzierte Transaktivierung aber auch Kernlokalisierung des NR.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Schritte:

- a. Zunächst werden Zellen, die EWS oder ein Derivat davon und NR oder ein Derivat davon exprimieren, der zu testenden Substanz ausgesetzt.

5

- b. Es folgt dann die Bestimmung des Einflusses der Substanz auf die Interaktion zwischen dem Rezeptor oder dessen Derivat und EWS oder dessen Derivats durch Messung der Protein-Protein-Interaktion oder der Protein-Protein-DNA-Interaktion.

10

Die Expression einer oder beider der miteinander interagierenden Komponenten (EWS/Derivat einerseits und NR/Derivat andererseits) kann in der Zelle von Natur aus oder infolge transienter oder stabiler Transfektion mit geeigneten Expressionsvektoren erfolgen. Die Auswahl geeigneter Zelltypen und ggf. Vektorsysteme stellt eine dem zuständigen Fachmann geläufige Massnahme dar. Zur Expression im eukaryontischen System eignen sich beispielsweise pCMX oder pSG5 als Vektoren.

15

Die Messung der Protein-Protein-Interaktion zwischen Rezeptor bzw. Derivat und EWS bzw. Derivat oder der Protein-Protein-DNA-Interaktion der vorgenannten Komponenten mit der DNA-Zielsequenz erfolgt durch dem Fachmann bekannte Massnahmen. Hierzu eignen sich beispielsweise Techniken wie das Two-Hybrid-System, Co-Immunpräzipitation, GST-Pull-down-Assays, FRET-Analysen und ABCD-Assays bzw. Gelretardationsassays zur Analyse von Protein-Protein-DNA Interaktionen.

20

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die Schritte:

25

- a. Zellen, die EWS oder Derivat davon und NR oder ein Derivat davon exprimieren und mit einem Reportergenkonstrukt transfiziert sind, werden dem Liganden des nukleären Rezeptors und der zu testenden Substanz ausgesetzt,
- b. Bestimmung der Transkriptionsaktivität von NR durch Messung der Reportergenaktivität und
- c. Vergleich mit der Transkriptionsaktivität bei Durchführung der Schritte a und b in Abwesenheit der zu testenden Substanz.

30

35

Reportergene sind Gene oder Genfragmente, die für möglichst einfach nachweisbare Genprodukte kodieren, z. B. photometrisch durch Farbreaktionen. Häufig verwendete Reportergene sind das Gen für β -Galactosidase, das Gen für die alkalische Phosphatase, das Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase, das Gen für die Catechol-Dioxygenase, das Gen für das „green“ oder „blue fluorescent protein“ sowie verschiede-

40

ne Luciferase-Gene, die die Zellen zum Leuchten bringen können. Durch Vorschaltung eines geeigneten Kontrollelementes, z.B. einer Promotor-Enhancer Sequenz, die unter der Kontrolle eines bestimmten Transkriptionsfaktors oder einer bestimmten Signaltransduktionskaskade steht, kann beispielsweise die Aktivität des Transkriptionsfaktors bzw. der Kaskade anhand der Menge des exprimierten Genproduktes bestimmt werden.

Herkömmlicherweise werden derartige Reportergene in geeigneten Vektoren unter Vorschaltung der interessierenden Promotor-Enhancer Sequenz in die Zellen eingebracht. Zur Analyse der steroidal Aktivität von Substanzen eignen sich – abhängig vom zu analysierenden NR - alle bekannten NR-Zielsequenzen. Beispiel einer solchen Vektors, ist der Vektor MMTV-Luciferase, der zur Messung der androgenen Wirkung von Substanzen eingesetzt wird.

Substanzen mit einem hormonellen Effekt, vorzugsweise einem androgen/antiandrogenen Effekt, sind dann an der im Vergleich zu Versuchsansätzen ohne Beigabe der zu testenden Substanz erhöhten bzw. verminderten Expression des Reportergens erkennbar.

Zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung eignen sich, neben wildtyp EWS, EWS Derivate, und hier besonders funktionelle EWS-Derivate, die die Fähigkeit behalten haben, die Aktivität mindestens eines nukleären Rezeptors, insbesondere die von Androgenrezeptoren, zu modulieren oder diesen zumindest zu binden (in durch geeignete Methoden nachweisbarer und nicht zu vernachlässigender Weise – z.B. in Protein-Protein Interaktionsassays wie EMSA; der zuständige Fachmann kann hier differenzieren). Analoges gilt für die NR-Derivate: Auch hier sind solche Derivate bevorzugt, die die Fähigkeit behalten haben, durch EWS oder seine funktionellen Derivate moduliert oder zumindest gebunden zu werden.

EWS und EWS kodierende Nukleinsäuren sind im Stand der Technik bereits bekannt (s.o.). Zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise ein durch die Nukleinsäure gemäß Seq. ID No.1 kodiertes EWS, bzw. ein abgeleitetes Derivat geeignet (insbesondere ein funktionelles Derivat). Besonders bevorzugt ist ein EWS Derivat, welches die Aminosäuren 319 bis 656 der in Seq. ID No. 1 beschriebene Sequenz aufweist, insbesondere ein Fragment, welches aus diesen Aminosäuren besteht.

Die Erfindung bezieht sich demgemäß auch auf die Verwendung von EWS bzw. dessen Derivaten zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, die die Aktivität von NR beeinflussen.

Die Erfindung betrifft überdies die Verwendung von Nukleinsäuren mit mindestens 70 % Homologie zu Seq. ID. No. 1 oder zum Sequenzbereich 8 bis 2032 oder dem Sequenzbereich 1000 bis 2011 der Seq. ID. No. 1 zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, die die Aktivität von Nukleäre Rezeptoren beeinflussen. Bevorzugterweise sind derartige Nukleinsäuren in Expressionskassetten geeigneter Expressionsvektoren, insbesondere eukaryontischer Expressionsvektoren, kloniert.

Der Begriff „Nukleinsäuren mit mindestens 70 % Homologie zu Seq. ID No.1“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung als den gesamten Bereich zwischen 70 % bis 100 % Homologie (also völlige Übereinstimmung mit Seq. ID No.1) betreffend verstanden. Die Auswahl von für den jeweiligen Zweck geeigneten Nukleinsäure im genannten Homologiebereich liegt im Bereich der herkömmlichen fachmännischen Fähigkeiten. Die Bestimmung der Nukleinsäurehomologie erfolgt in dem zuständigen Fachmann geläufiger Weise. Hierzu können verschiedene, dem Fachmann bekannte Computer Programme verwendet werden (z.B BLAST; BLAST-2, ALIGN oder Megalign (DNASTAR)).

Das erfindungsgemäße Verfahren bzw. die erfindungsgemäße Verwendung der genannten Proteine bzw. Nukleinsäuren eignet sich insbesondere zur Analyse des hormonellen Effektes von Substanzen auf Androgenrezeptoren, Estrogenrezeptoren (α und β), Progesteronrezeptoren (A und B), Glukokortikoidrezeptoren, Mineralokortikoidrezeptoren, Schilddrüsenhormonrezeptoren, Vitamin-D-Rezeptoren, Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptoren, Retinsäurerezeptoren, Retinoid-X-Rezeptoren oder Orphan-Rezeptoren. Aufgrund der besonders gut charakterisierten Wirkung von EWS bzw. EWS-Derivaten auf den Androgenrezeptor, kommt dieser in besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung zum Einsatz.

Überdies findet EWS Verwendung als klinischer Indikator androgenbedingter Erkrankungen. Relevante androgenbedingte Erkrankungen sind z.B. Prostatakrebs, Glatzenbildung, Akne oder Hypogonadismus, sowie Androgenresistenzsyndrome, wie z.B. die testikuläre Feminisierung. Diese beruhen vermutlich auf Defekten im Co-Modulationsmechanismus zwischen Androgenrezeptor (AR) und EWS. Eine plausible diagnostische Möglichkeit bei Patienten mit derartigen Störungen bestünde somit in der Messung der relativen Raten von AR und EWS. Dies ist möglich durch Anwendung quantitativer Verfahren zur Messung der relativen Menge beider Moleküle in dem Zielgewebe bei dem jeweiligen Patienten.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung bezieht sich demgemäß auf die Verwendung einer Nukleinsäure mit mindestens 70% Homologie zu Seq. ID No.1, zum Sequenzbereich 8 bis 2032 oder 1000 bis 2011 der Seq. ID No.1 oder eines Antikörpers, welcher gegen ein durch eine dieser Nukleinsäuren kodiertes Protein gerichtet ist, zur Diagnose von Er-

krankungen, welche mit einer Dysfunktion einer NR-Aktivität, vorzugsweise der Androgenrezeptor Aktivität einhergehen.

5 Eine solche Verwendung kommt vorzugsweise im Rahmen eines Verfahrens zur Bestimmung von Störungen im Co-Modulationsmechanismus zwischen einem Androgenrezeptor und EWS zur Anwendung, bei dem die zellulären Konzentrationen oder Gewebskonzentrationen von Androgenrezeptor und EWS gemessen werden. Unter den verschiedenen, dem Fachmann hierzu geeigneten Techniken eignen sich insbesondere Radioimmunoassays, ELISAs, Immunfärbungen, quantitative RT-PCRs oder Western Blots.

10 Derartigen Messungen der relativen Raten von AR versus EWS liegt die Theorie zugrunde, dass ein Androgenresistenzsyndrom auf einer Störung des Gleichgewichts zwischen AR- und EWS-Prävalenz in den Zielzellen beruht. Zuviel EWS könnte zu einer Überempfindlichkeit des AR-Systems führen, so dass es auf Moleküle reagiert, die normalerweise keinen androgenen Effekt haben. Unterempfindlichkeit durch Fehlen oder Fehlfunktion von EWS kann auf allen Ebenen zur Androgenresistenz führen.

20 Darüber hinaus ist es möglich, mit Hilfe geeigneter EWS-cDNA Primer, einen PCR-Assay zu konstruieren, mit dem sich bei bestimmten Patienten Mutationen der normalen DNA-Sequenz nachweisen oder Transkripte für den Northern Blot Assay bzw. eine DNA für In-situ-Hybridisierungsassays generieren lassen.

25 Der Nachweis von zu viel EWS bei einem Patienten spräche für die Anwendung von Mitteln oder Maßnahmen zur Senkung des EWS Spiegels, beispielsweise mittels Antisense-Nukleinsäuren gegen EWS oder EWS Derivate oder ähnlicher Techniken, um unter klinischen Bedingungen den EWS-Titer bei dem jeweiligen Patienten zu reduzieren. Dasselbe könnte durch Moleküle erreicht werden, die in der Lage sind, die Interaktion zwischen AR und EWS zu hemmen.

30 Hat ein Patient dagegen einen zu niedrigen EWS-Spiegel, könnte man ihm EWS-cDNA, -Protein oder -DNA über verschiedene Mechanismen zuführen, um auf diese Weise den Titer des aktiven EWS zu erhöhen. Ein weiterer Aspekt der Erfindung bezieht sich demgemäß auf die Verwendung der vorgenannten EWS oder EWS-Derivate kodierenden Nukleinsäuren bzw. EWS Proteine EWS-Derivate die durch eine solche Nukleinsäure kodiert werden, zur Therapie von durch die Dysfunktion der NR-Aktivität bedingten Erkrankungen.

40 Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Beispiels unter bezugnahme auf die Abbildungen näher erläutert.

Es stellen dar: Abbildung 1 eine schematische Darstellung des Gens für den Androgenrezeptor (AR) und das AR2-Fragment,
 Abbildung 2 eine schematische Darstellung des Gens für das Ewing-Sarkom-Protein (EWS),
 Abbildung 3 die Sequenzen von EWS-Exonen und –Proteinen
 Abbildung 4 die Co-Aktivierung des AR-Signals in SH-SY5Y-Zellen,
 Abbildung 5 zeigt die Gewebsverteilung des EWS-Transkripts (Abb. 5a) und des AR-Transkripts (Abb. 5b).

Beispiel 1:

Verwendete Oligonukleotide:

Primer für die PCR-Amplifikation der Bibliotheks-Inserts:

Act2c5050Eco: gattacgctagcttggtgg (SEQ ID Nr. 3)

Act2-4939Xho: gttgaagtgaactggcgggg (SEQ ID Nr. 4)

Primer für die Amplifikation von EWS-cDNA in voller Länge:

EWS-8-Sal: gggctgcacggacgttgagagaacgagg (SEQ ID Nr. 5)

cESW-c2032-Eco: gggaattctgcggggtctctgcacatctagtagg (SEQ ID Nr. 6)

Sequenzierungs Primer:

XII-139a1: gcttgggtggtcatatgg (SEQ ID Nr. 7)

Verwendete Vektoren:

pACT2 (Genbank-Zugangsnummer U29899) für die Bibliothek;

pGBT9-Derivate für die Sonden: pGBT9rev und pGBT(+1)rev (Roder, K. H.; Wolf, S.S.; Schweizer, M., 1996, Analytical Biochemistry 241, 260-62);

pCR2.1Topo-Vektor (Firma Invitrogen) für die Klonierung von PCR-Fragmenten;

CMX-Vektor für die Expression in Säugetierzellen;

pAHLuc für den Reporter-Gen-Assay (enthält den MMTV-Promoter und ein Luciferase-Reporter-Gen; Firma A. Cato);

pSG5AR (pSG5 mit dem humanen Gen für den Androgenrezeptor; Genbank-Zugangsnummer AAA51775).

Verwendete Organismen:

Hefestämme: Y187 und PJ69-2A

E.-coli-Stamm: DH5 α
 Säugetierzellen: SH-SY5Y (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ): DSM ACC209);
 PC3 (American type Culture Collection (ATCC): CRL-1435);
 PC3AR: mit pSG5AR stabil transfizierte PC3 (Firma A. Cato, Karlsruhe, Deutschland).

Zur Identifizierung neuer Co-Modulatoren des Androgenrezeptors, wurde mit Hilfe des Hefe-Zweihybrid-Systems eine cDNA-Bibliothek Humane cDNA-Bibliothek („Matchmaker“ der Firma Clontech; Nr. HY4028AH) aus fetalem Gehirn mit drei verschiedenen Fragmenten des Androgenrezeptors (AR) als Sonde gescreent.

Hierzu wurde der Vektor pSG5AR, der die cDNA für den humanen AR enthält (Genbank AAA51775), mit Hilfe der Endonuklease PstI so aufgespalten, dass drei verschiedene AR-DNA-Fragmente entstanden. Das kürzeste dieser Fragmente (AR4) kodiert für den N-Terminus des Rezeptors (AS 1–56), das mittlere (AR3) für den Mittelteil mit den Aktivierungsdomänen (AS 57–324) und das längste (AR2) für den C-Terminus (AS 325–918) mit der DNA- und der Ligandenbindungsdomäne (DBD und LBD; vergleiche Übersicht in Abbildung 1). AR2 wurde in den pGBT9(+1)rev-Vektor kloniert, nachdem dieser vorher mit Hilfe von PstI linearisiert worden war.

Anschliessend erfolgte die Transformation des pGBT-Vektors, der das AR-Fragment enthielt, in den Hefestamm PJ69-2A. Die positiven Transformanten (Trp+) wurden nach den Anweisungen des Herstellers (Clontech) mit einer aus fetalem Gehirn gewonnenen cDNA-Bibliothek inkubiert (Humane Multiple-Tissue-cDNA (MTC), Panel II der Firma Clontech; Kat.: Nr. K1421-1). In Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers (Clontech) wurden 3×10^6 Klone gescreent. Die positiven Klone wurden selektiert und nach den Anweisungen des Herstellers (Clontech) auf ihre β -Galaktosidase-Aktivität getestet. Die der Bibliothek entstammenden Inserts blauer Kolonien wurden mittels PCR und unter Verwendung der Primer Act2c5050Eco und Act 2-4939Xho direkt aus den Hefezellen amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch ihrer Länge nach aufgetrennt und mittels Spaltung durch MspI weiter analysiert. Mindestens ein Exemplar jedes Restriktionsfragmentmusters wurde unter Verwendung von XII-139a1 als Sequenzprimer sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der Genbank oder der Datenbank Incyte abgeglichen.

Eines der mehrfach identifizierten Inserts hatte eine Länge von 1500 bp und konnte durch Sequenzierung und Sequenzvergleich mit der Datenbank NCBJ als für den C-terminalen Anteil des menschlichen EWS (AS 319–656) kodierend identifiziert werden (Übersicht in Abbildung 2; Aminosäuresequenz in Abbildung 3).

Abbildung 3 zeigt cDNA Sequenz von humanem EWS mitsamt der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Dargestellt sind die Exone 1 bis 17. Die fettgedruckten Buchstaben bezeichnen das Fragment, das in Hefe-Zweihybrid-Systemen zu finden ist und an den AR-Abschnitt AS 325 bis AS 919 bindet. Unterstrichen sind die in den Splice-Varianten ESW1-b (durchgängig unterstrichen) bzw. EWS1-c (gepunktete Unterstreichung) fehlenden Sequenzbereiche.

Mittels PCR und unter Verwendung der Primer EWS-8-Sal und cEWS-c2032-Eco sowie Thymus- oder Milz-cDNA der Firma Clontech wurde EWS in voller Länge amplifiziert, wobei aus der Milz die vollständige codierende Region des Transkriptes und aus dem Thymus die Variante mit Exon 15 B anstelle von Exon 15 isoliert wurde. Die amplifizierte cDNA wurde dann mit EcoRI und Sal I in die Expressionscassette des Säugetierexpressionsvektors CMX kloniert.

Wie aus dem in Abbildung 4 dargestellten Säulendiagramm hervorgeht, ist EWS nach transienter Transfektion in SH-SY5Y-Zellen fähig, eine starke Co-Aktivierung der AR-Signaltätigkeit herbeizuführen, insbesondere bei niedrigen Androgenkonzentrationen von 10^{-12} – 10^{-10} mol. Hierzu wurden auf Reaktionsplatten mit jeweils sechs Reaktionsmulden SH-SY5Y-Zellen mit 0,75 µg eines Vektors, der die cDNA für den humanen Androgenrezeptor enthielt (pSG5AR), 1,5 µg des Reportergenkonstrukts pAHLuc, das vor dem Luciferase-Gen den MMTV-Promotor enthält, und 1 µg des EWS-CMX-Vektors co-transfiziert. Die Transfektion erfolgte unter Verwendung von Lipofectin von der Firma Gibco BRC nach Angaben des Herstellers. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht mit unterschiedlichen Androgenmengen inkubiert. Die Zellen wurden mit einem herkömmlichen Lysispuffer lysiert, und die Luciferase-Aktivität im Lumistar-Luminometer von BMG Lab Technologies gemessen. Die EWS-CMX-Luciferase-Aktivitäten wurden mit den Kontrollaktivitäten verglichen (leerer CMX-Vektor). Die Mischung in jeder Mulde wurde in vier Mulden einer Mikrotiterplatte gemessen. Die Kontrollwerte der Substanz ohne DHT wurden subtrahiert. Die Standardabweichung ist in der Abbildung 4 durch Balken eingezeichnet.

Die Gewebeverteilung des humanen EWS in normalem humanen Gewebe ist in Abbildung 5a anhand der dargestellten Autoradiographien ersichtlich. Hierzu wurde ein

EWS-cDNA-Fragment, das für die Aminosäuren 244–656 von EWS kodiert, nach dem Megaprime™ DNA-Markierungssystem (Amersham Life Science) mit ^{32}P - α -dATP und dem Klenow-Fragment markiert. Das markierte Fragment wurde auf einer Nick-Säule (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers gereinigt und mit Human-Blots; Human Northern Blot (MTN) der Firma Clontech Nr. 7760-1 und 7759-1) der Firma Clontech hybridisiert. Wie aus der Abbildung 5a hervorgeht, wird EWS-RNA vorwiegend in den Hoden exprimiert. Darüber hinaus sind in den meisten untersuchten Organen unterschiedliche EWS-Mengen nachweisbar.

Abb. 5b zeigt die Gewebeverteilung des humanen AR in normalem humanen Gewebe.

Aus den Abb. 5a und 5b lassen sich die Normexpressionen dieser beiden Proteine im Gewebe ermitteln.

Abbildung 4 zeigt die Co-Aktivierung des AR-Signals in SH-SY5Y-Zellen. In eine Reaktionsplatte mit sechs Reaktionsmulden wurden pro Mulde 1 μg Co-Aktivator, 1,5 μg MMTV-Luciferase und 0,75 μg pSG5AR-Plasmid gegeben. Die sechs Mischungen wurden in jeweils vier Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt und dort gemessen. Die Fehlerabweichung ist als SD angegeben. Bei allen Signalen wurden die Werte der entsprechenden Kontrollen ohne DHT subtrahiert.

Abbildung 5a zeigt die Gewebsverteilung des EWS-Transkripts (Northern Blot MTN der Firma Clontech). Nach den Anweisungen des Herstellers (Amersham) erfolgte ein Zufallspriming des EWS-cDNA-Fragments, das für die Aminosäuren 244 bis 656 kodiert, und eine Markierung mit ^{32}P - α dATP und dem Klenow-Fragment. Die Blots wurden mit der Sonde hybridisiert, gewaschen, auf einen Film übertragen und entwickelt.

SEQUENZPROTOKOLL

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> JENAPHARM GmbH & Co. KG

<120> Verfahren zur Bestimmung des hormonellen Effekts von
Substanzen

10 <130> Pat 3684/11

<140>

<141>

15 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 2390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> EWS

25 <221> CDS

<222> (44)..(2011)

<400> 1

30 agaggggagac ggacgttgag agaacgagga ggaaggagag aaa atg gcg tcc acg 55
Met Ala Ser Thr
1

gat tac agt acc tat agc caa gct gca gcg cag cag ggc tac agt gct 103
Asp Tyr Ser Thr Tyr Ser Gln Ala Ala Ala Gln Gln Gly Tyr Ser Ala
35 5 10 15 20

tac acc gcc cag ccc act caa gga tat gca cag acc acc cag gca tat 151
Tyr Thr Ala Gln Pro Thr Gln Gly Tyr Ala Gln Thr Thr Gln Ala Tyr
25 30 35

ggg caa caa agc tat gga acc tat gga cag ccc act gat gtc agc tat 199
Gly Gln Gln Ser Tyr Gly Thr Tyr Gly Gln Pro Thr Asp Val Ser Tyr
40 45 50

45 acc cag gct cag acc act gca acc tat ggg cag acc gcc tat gca act 247
Thr Gln Ala Gln Thr Thr Ala Thr Tyr Gly Gln Thr Ala Tyr Ala Thr
55 60 65

tct tat gga cag cct ccc act ggt tat act act cca act gcc ccc cag 295
50 Ser Tyr Gly Gln Pro Pro Thr Gly Tyr Thr Thr Pro Thr Ala Pro Gln
70 75 80

gca tac agc cag cct gtc cag ggg tat ggc act ggt gct tat gat acc 343
Ala Tyr Ser Gln Pro Val Gln Gly Tyr Gly Thr Gly Ala Tyr Asp Thr
55 85 90 95 100

	acc	act	gct	aca	gtc	acc	acc	acc	cag	gcc	tcc	tat	gca	gct	cag	tct	391
	Thr	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Thr	Thr	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gln	Ser	
					105					110					115		
5																	
	gca	tat	ggc	act	cag	cct	gct	tat	cca	gcc	tat	ggg	cag	cag	cca	gca	439
	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ala	Tyr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	
				120					125					130			
10	gcc	act	gca	cct	aca	aga	ccg	cag	gat	gga	aac	aag	ccc	act	gag	act	487
	Ala	Thr	Ala	Pro	Thr	Arg	Pro	Gln	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Thr	Glu	Thr	
				135				140					145				
	agt	caa	cct	caa	tct	agc	aca	ggg	ggg	tac	aac	cag	ccc	agc	cta	gga	535
15	Ser	Gln	Pro	Gln	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Tyr	Asn	Gln	Pro	Ser	Leu	Gly	
		150					155					160					
	tat	gga	cag	agt	aac	tac	agt	tat	ccc	cag	gta	cct	ggg	agc	tac	ccc	583
20	Tyr	Gly	Gln	Ser	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Gln	Val	Pro	Gly	Ser	Tyr	Pro	
	165				170						175					180	
	atg	cag	cca	gtc	act	gca	cct	cca	tcc	tac	cct	cct	acc	agc	tat	tcc	631
25	Met	Gln	Pro	Val	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Ser	Tyr	Ser	
				185						190					195		
	tct	aca	cag	ccg	act	agt	tat	gat	cag	agc	agt	tac	tct	cag	cag	aac	679
	Ser	Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Tyr	Asp	Gln	Ser	Ser	Tyr	Ser	Gln	Gln	Asn	
				200					205					210			
30																	
	acc	tat	ggg	caa	ccg	agc	agc	tat	gga	cag	cag	agt	agc	tat	ggg	caa	727
	Thr	Tyr	Gly	Gln	Pro	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Gln	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	
			215					220					225				
35	caa	agc	agc	tat	ggg	cag	cag	cct	ccc	act	agt	tac	cca	ccc	caa	act	775
	Gln	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gln	Gln	Pro	Pro	Thr	Ser	Tyr	Pro	Pro	Gln	Thr	
		230				235						240					
	gga	tcc	tac	agc	caa	gct	cca	agt	caa	tat	agc	caa	cag	agc	agc	agc	823
40	Gly	Ser	Tyr	Ser	Gln	Ala	Pro	Ser	Gln	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	
	245				250					255					260		
	tac	ggg	cag	cag	agt	tca	ttc	cga	cag	gac	cac	ccc	agt	agc	atg	ggg	871
45	Tyr	Gly	Gln	Gln	Ser	Ser	Phe	Arg	Gln	Asp	His	Pro	Ser	Ser	Met	Gly	
				265						270					275		
	gtt	tat	ggg	cag	gag	tct	gga	gga	ttt	tcc	gga	cca	gga	gag	aac	cgg	919
	Val	Tyr	Gly	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Gly	Glu	Asn	Arg	
				280					285					290			
50																	
	agc	atg	agt	ggc	cct	gat	aac	cgg	ggc	agg	gga	aga	ggg	gga	ttt	gat	967
	Ser	Met	Ser	Gly	Pro	Asp	Asn	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Phe	Asp	
			295					300					305				
55	cgt	gga	ggc	atg	agc	aga	ggg	ggg	cgg	gga	gga	gga	cgc	ggg	gga	atg	1015
	Arg	Gly	Gly	Met	Ser	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Met	
		310					315						320				

ggc agc gct gga gag cga ggt ggc ttc aat aag cct ggt gga ccc atg 1063
 Gly Ser Ala Gly Glu Arg Gly Gly Phe Asn Lys Pro Gly Gly Pro Met
 325 330 335 340
 5
 gat gaa gga cca gat ctt gat cta ggc cca cct gta gat cca gat gaa 1111
 Asp Glu Gly Pro Asp Leu Asp Leu Gly Pro Pro Val Asp Pro Asp Glu
 345 350 355
 10 gac tct gac aac agt gca att tat gta caa gga tta aat gac agt gtg 1159
 Asp Ser Asp Asn Ser Ala Ile Tyr Val Gln Gly Leu Asn Asp Ser Val
 360 365 370
 act cta gat gat ctg gca gac ttc ttt aag cag tgt ggg gtt gtt aag 1207
 15 Thr Leu Asp Asp Leu Ala Asp Phe Phe Lys Gln Cys Gly Val Val Lys
 375 380 385
 atg aac aag aga act ggg caa ccc atg atc cac atc tac ctg gac aag 1255
 Met Asn Lys Arg Thr Gly Gln Pro Met Ile His Ile Tyr Leu Asp Lys
 390 395 400
 20
 gaa aca gga aag ccc aaa ggc gat gcc aca gtg tcc tat gaa gac cca 1303
 Glu Thr Gly Lys Pro Lys Gly Asp Ala Thr Val Ser Tyr Glu Asp Pro
 405 410 415 420
 25
 ccc act gcc aag gct gcc gtg gaa tgg ttt gat ggg aaa gat ttt caa 1351
 Pro Thr Ala Lys Ala Ala Val Glu Trp Phe Asp Gly Lys Asp Phe Gln
 425 430 435
 30 ggg agc aaa ctt aaa gtc tcc ctt gct cgg aag aag cct cca atg aac 1399
 Gly Ser Lys Leu Lys Val Ser Leu Ala Arg Lys Lys Pro Pro Met Asn
 440 445 450
 agt atg cgg ggt ggt ctg cca ccc cgt gag ggc aga ggc atg cca cca 1447
 35 Ser Met Arg Gly Gly Leu Pro Pro Arg Glu Gly Arg Gly Met Pro Pro
 455 460 465
 cca ctc cgt gga ggt cca gga ggc cca gga ggt cct ggg gga ccc atg 1495
 40 Pro Leu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Gly Pro Met
 470 475 480
 ggt cgc atg gga ggc cgt gga gga gat aga gga ggc ttc cct cca aga 1543
 45 Gly Arg Met Gly Gly Arg Gly Gly Asp Arg Gly Gly Phe Pro Pro Arg
 485 490 495 500
 gga ccc cgg ggt tcc cga ggg aac ccc tct gga gga gga aac gtc cag 1591
 Gly Pro Arg Gly Ser Arg Gly Asn Pro Ser Gly Gly Gly Asn Val Gln
 505 510 515
 50
 cac cga gct gga gac tgg cag tgt ccc aat ccg ggt tgt gga aac cag 1639
 His Arg Ala Gly Asp Trp Gln Cys Pro Asn Pro Gly Cys Gly Asn Gln
 520 525 530
 55 aac ttc gcc tgg aga aca gag tgc aac cag tgt aag gcc cca aag cct 1687
 Asn Phe Ala Trp Arg Thr Glu Cys Asn Gln Cys Lys Ala Pro Lys Pro
 535 540 545

gaa ggc ttc ctc ccg cca ccc ttt ccg ccc ccg ggt ggt gat cgt ggc 1735
 Glu Gly Phe Leu Pro Pro Pro Phe Pro Pro Pro Gly Gly Asp Arg Gly
 550 555 560
 5
 aga ggt ggc cct ggt ggc atg cgg gga gga aga ggt ggc ctc atg gat 1783
 Arg Gly Gly Pro Gly Gly Met Arg Gly Gly Arg Gly Gly Leu Met Asp
 565 570 575 580
 10 cgt ggt ggt ccc ggt gga atg ttc aga ggt ggc cgt ggt gga gac aga 1831
 Arg Gly Gly Pro Gly Gly Met Phe Arg Gly Gly Arg Gly Gly Asp Arg
 585 590 595
 ggt ggc ttc cgt ggt ggc cgg ggc atg gac cga ggt ggc ttt ggt gga 1879
 15 Gly Gly Phe Arg Gly Gly Arg Gly Met Asp Arg Gly Gly Phe Gly Gly
 600 605 610
 gga aga cga ggt ggc cct ggg ggg ccc cct gga cct ttg atg gaa cag 1927
 Gly Arg Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Pro Gly Pro Leu Met Glu Gln
 615 620 625
 20
 atg gga gga aga aga gga gga cgt gga gga cct gga aaa atg gat aaa 1975
 Met Gly Gly Arg Arg Gly Gly Arg Gly Gly Pro Gly Lys Met Asp Lys
 630 635 640
 25
 ggc gag cac cgt cag gag cgc aga gat cgg ccc tac tagatgcaga 2021
 Gly Glu His Arg Gln Glu Arg Arg Asp Arg Pro Tyr
 645 650 655
 30 gaccccgag agctgcattg actaccagat ttatttttta aaccagaaaa tgttttaa 2081
 ttataattcc atatttataa tggtggccac aacattatga ttattccttg totgtacttt 2141
 agtatttttc accatttgtg aagaaacatt aaaacaagtt aaatggtagt gtgcggagtt 2201
 35 tttttttctt cttcttttta aaaatgggtg ttttaagactt taacaatggg aaccccttgt 2261
 gagcatgctc agtatcattg tggagaacca agagggcctc ttaactgtaa caatgttcat 2321
 40 gggtgtgatg tttttttttt ttttttaaaa taaaattcca aatgtttaat aaaaaaaaaa 2381
 aaaaaaaaaa 2390
 45 <210> 2
 <211> 656
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 2
 Met Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Thr Tyr Ser Gln Ala Ala Ala Gln Gln
 1 5 10 15
 Gly Tyr Ser Ala Tyr Thr Ala Gln Pro Thr Gln Gly Tyr Ala Gln Thr
 55 20 25 30

Thr Gln Ala Tyr Gly Gln Gln Ser Tyr Gly Thr Tyr Gly Gln Pro Thr
 35 40 45
 Asp Val Ser Tyr Thr Gln Ala Gln Thr Thr Ala Thr Tyr Gly Gln Thr
 5 50 55 60
 Ala Tyr Ala Thr Ser Tyr Gly Gln Pro Pro Thr Gly Tyr Thr Thr Pro
 65 70 75 80
 10 Thr Ala Pro Gln Ala Tyr Ser Gln Pro Val Gln Gly Tyr Gly Thr Gly
 85 90 95
 Ala Tyr Asp Thr Thr Thr Ala Thr Val Thr Thr Thr Gln Ala Ser Tyr
 100 105 110
 15 Ala Ala Gln Ser Ala Tyr Gly Thr Gln Pro Ala Tyr Pro Ala Tyr Gly
 115 120 125
 Gln Gln Pro Ala Ala Thr Ala Pro Thr Arg Pro Gln Asp Gly Asn Lys
 20 130 135 140
 Pro Thr Glu Thr Ser Gln Pro Gln Ser Ser Thr Gly Gly Tyr Asn Gln
 145 150 155 160
 25 Pro Ser Leu Gly Tyr Gly Gln Ser Asn Tyr Ser Tyr Pro Gln Val Pro
 165 170 175
 Gly Ser Tyr Pro Met Gln Pro Val Thr Ala Pro Pro Ser Tyr Pro Pro
 180 185 190
 30 Thr Ser Tyr Ser Ser Thr Gln Pro Thr Ser Tyr Asp Gln Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Ser Gln Gln Asn Thr Tyr Gly Gln Pro Ser Ser Tyr Gly Gln Gln Ser
 35 210 215 220
 Ser Tyr Gly Gln Gln Ser Ser Tyr Gly Gln Gln Pro Pro Thr Ser Tyr
 225 230 235 240
 40 Pro Pro Gln Thr Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gln Tyr Ser Gln
 245 250 255
 Gln Ser Ser Ser Tyr Gly Gln Gln Ser Ser Phe Arg Gln Asp His Pro
 260 265 270
 45 Ser Ser Met Gly Val Tyr Gly Gln Glu Ser Gly Gly Phe Ser Gly Pro
 275 280 285
 Gly Glu Asn Arg Ser Met Ser Gly Pro Asp Asn Arg Gly Arg Gly Arg
 50 290 295 300
 Gly Gly Phe Asp Arg Gly Gly Met Ser Arg Gly Gly Arg Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 55 Arg Gly Gly Met Gly Ser Ala Gly Glu Arg Gly Gly Phe Asn Lys Pro
 325 330 335

Gly Gly Pro Met Asp Glu Gly Pro Asp Leu Asp Leu Gly Pro Pro Val
 340 345 350

5 Asp Pro Asp Glu Asp Ser Asp Asn Ser Ala Ile Tyr Val Gln Gly Leu
 355 360 365

Asn Asp Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Asp Phe Phe Lys Gln Cys
 370 375 380

10 Gly Val Val Lys Met Asn Lys Arg Thr Gly Gln Pro Met Ile His Ile
 385 390 395 400

Tyr Leu Asp Lys Glu Thr Gly Lys Pro Lys Gly Asp Ala Thr Val Ser
 405 410 415

15 Tyr Glu Asp Pro Pro Thr Ala Lys Ala Ala Val Glu Trp Phe Asp Gly
 420 425 430

20 Lys Asp Phe Gln Gly Ser Lys Leu Lys Val Ser Leu Ala Arg Lys Lys
 435 440 445

Pro Pro Met Asn Ser Met Arg Gly Gly Leu Pro Pro Arg Glu Gly Arg
 450 455 460

25 Gly Met Pro Pro Pro Leu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Gly Pro
 465 470 475 480

30 Gly Gly Pro Met Gly Arg Met Gly Gly Arg Gly Gly Asp Arg Gly Gly
 485 490 495

Phe Pro Pro Arg Gly Pro Arg Gly Ser Arg Gly Asn Pro Ser Gly Gly
 500 505 510

35 Gly Asn Val Gln His Arg Ala Gly Asp Trp Gln Cys Pro Asn Pro Gly
 515 520 525

Cys Gly Asn Gln Asn Phe Ala Trp Arg Thr Glu Cys Asn Gln Cys Lys
 530 535 540

Ala Pro Lys Pro Glu Gly Phe Leu Pro Pro Pro Phe Pro Pro Pro Gly
 545 550 555 560

45 Gly Asp Arg Gly Arg Gly Gly Pro Gly Gly Met Arg Gly Gly Arg Gly
 565 570 575

Gly Leu Met Asp Arg Gly Gly Pro Gly Gly Met Phe Arg Gly Gly Arg
 580 585 590

50 Gly Gly Asp Arg Gly Gly Phe Arg Gly Gly Arg Gly Met Asp Arg Gly
 595 600 605

Gly Phe Gly Gly Gly Arg Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Pro Gly Pro
 610 615 620

55 Leu Met Glu Gln Met Gly Gly Arg Arg Gly Gly Arg Gly Gly Pro Gly
 625 630 635 640

Lys Met Asp Lys Gly Glu His Arg Gln Glu Arg Arg Asp Arg Pro Tyr
 645 650 655

5

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> synthetisch

10

<220> Primer
 <400> 3
 gattacgcta gcttgggtgg

20

15

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> synthetisch

20

<220> Primer
 <400> 4
 gttgaagtga acttggcggg g

21

25

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> synthetisch

30

<220> Primer
 <400> 5
 gggtcgacgg acgttgagag aacgagg

27

35

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> synthetisch

40

<220> Primer
 <400> 6
 gggaattctg cggggtctct gcatctagta ggg

69

45

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> synthetisch

50

<220> Primer
 <400> 7
 gcttgggtgg tcatatgg

17

55

Patentanwälte
GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.)

European Patent and Trademark Attorneys

MÜNCHEN – JENA

Büro München / Munich Offices:

Perhamerstraße 31 · D-80687 München · Telefon: (089) 5 46 15 20 · Telefax: (089) 5 46 03 92 · e-mail: gefepat.muc@t-online.de

Büro Jena / Jena Offices:

Sellierstraße 1 · D-07745 Jena · Telefon: (036 41) 2 91 50 · Telefax: (036 41) 29 15 21 · e-mail: gefepat.jena@t-online.de

5

JENAPHARM GmbH & Co. KG
Anwaltsakte: Pat 3684/11

4. März 2003
H/18/jb(sb)kt

10

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des hormonellen Effektes von Substanzen mit den Schritten

- a. Kontaktieren von EWS Protein oder einem Derivat davon mit NR oder einem Derivat davon und einer Testsubstanz, und
- b. Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Bindung von EWS Protein oder dessen Derivat und NR oder dessen Derivat, oder
- c. Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Liganden-induzierte Aktivität des nukleären Rezeptors.

20

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Schritt im zellulären System abläuft.

25

3. Verfahren gemäß Anspruch 2 mit den folgenden Schritten:

- a. Zellen, die EWS Protein oder Derivat davon und NR oder ein Derivat davon exprimieren, werden der zu testenden Substanz ausgesetzt,
- b. Bestimmung des Einflusses der Substanz auf die Interaktion zwischen dem Rezeptor oder dessen Fragment und EWS Protein oder Derivat durch Messung der Protein-Protein-Interaktion oder der Protein-Protein-DNA Interaktion.

30

4. Verfahren gemäß Anspruch 2 mit den folgenden Schritten:

- a. Zellen, die EWS Protein oder Derivat davon und NR oder ein Derivat davon exprimieren und mit einem Reportergenkonstrukt transfiziert sind, werden dem Liganden des NR und der zu testenden Substanz ausgesetzt,
- b. Bestimmung der Transkriptionsaktivität des NR durch Messung der Reportergenaktivität und

35

c. Vergleich mit der Transkriptionsaktivität bei Durchführung der Schritte a und b in Abwesenheit der zu testenden Substanz.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen eukaryontische Zellen, vorzugsweise Prostatazellen, Nervenzellen, Gliazellen, Fibroblasten, Blutzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Hepatozyten, Epithelzellen oder Muskelzellen sind.
6. Verwendung von EWS Protein oder einen Derivat davon, das die Funktion aufweist, die Aktivität mindestens eines NR zu modulieren, zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, die die Aktivität von NR beeinflussen.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder Verwendung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das EWS-Derivat ein durch Aminosäure-Deletion, Substitution, Insertion, Inversion, Addition oder Austausch entstandenes Derivat des von der Nukleinsäuresequenz gemäß Seq. ID No.1 kodierten Polypeptids umfasst.
8. Verwendung einer für EWS oder für ein EWS-Derivat kodierenden Nukleinsäure zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, die die Aktivität von NR beeinflussen.
9. Verwendung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure mindestens 70% Homologie zu Seq. ID. No. 1 oder zum Sequenzbereich 8 bis 2032 oder dem Sequenzbereich 1000 bis 2011 der Seq. ID. No. 1 aufweist.
10. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure in die Expressionskassette eines Expressionsvektors kloniert ist.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, oder Verwendung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der NR ein Androgenrezeptor, Estrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, Glukokortikoidrezeptor, Mineralokortikoidrezeptor, Schilddrüsenhormonrezeptor, Vitamin-D-Rezeptor, Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor, Retinsäurerezeptor, Retinoid-X-Rezeptor oder ein Orphan-Rezeptor und vorzugsweise ein Androgenrezeptor ist.
12. Verwendung einer Nukleinsäure mit mindestens 70% Homologie zu Seq. ID No.1, zum Sequenzbereich 8 bis 2032 oder 1000 bis 2011 der Seq. ID No.1 oder eines Antikörpers, welcher gegen ein durch eine dieser Nukleinsäuren kodiertes Protein gerichtet ist, zur Diagnose von Erkrankungen, welche mit einer Dysfunktion einer NR-Aktivität, vorzugsweise der Androgenrezeptor Aktivität einhergehen.

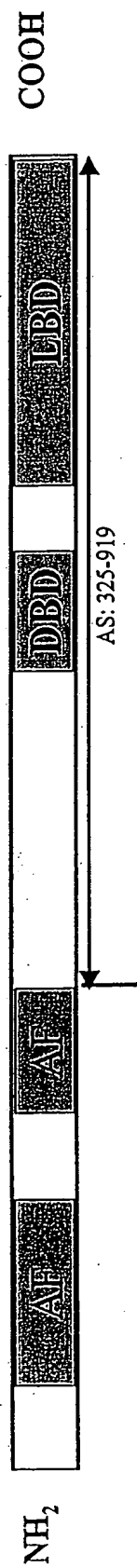
13. Verwendung einer der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 12, eines Proteins, welches durch eine solche Nukleinsäure kodiert wird, oder einer gegen eine solche Nukleinsäure gerichtete Antisense-Nukleinsäure zur Therapie von durch die Dysfunktion der NR-Aktivität bedingten Erkrankungen.

5

14. Verfahren zur Bestimmung von Störungen im Co-Modulationsmechanismus zwischen einem Androgenrezeptor und EWS, wobei die zellulären Konzentrationen und/oder Gewebskonzentration von Androgenrezeptor und EWS gemessen werden.

10

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Konzentrationsmessung durch Radioimmunoassay, ELISA, Immunfärbung, RT-PCR, Western-Blot oder Northern-Blot erfolgt.



1/8

Abb. 1: Schematische Darstellung des Gens für den Androgenrezeptor (AR) und das AR2-Fragment

AS 325-919: Androgenrezeptor-Fragment 2

AS: Aminosäure(n)

AF: Aktivierungsdomäne

DBD: DNA-Bindungsdomäne

LBD: Ligandenbindungsdomäne

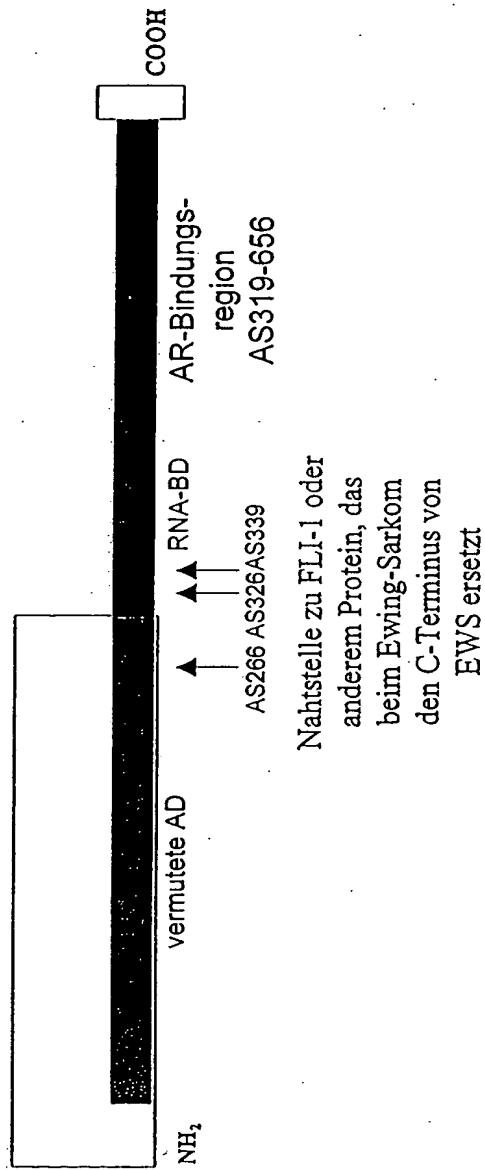


Abb. 2: Schematische Darstellung des Gens für das Ewing-Sarkom-Protein (EWS)

blau: RNA-Bindungsdomäne
 dunkelrot: Androgenrezeptorbindungsregion (AS 319-656)
 AS: Aminosäure(n)
 AD: Aktivierungsdomäne
 BD: Bindungsdomäne

3/8

M A S T D

>>>>

>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>exon 1>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

Y S T Y S Q A A A Q Q G Y S A Y T A Q P

>>>>>>>>>>exon 2>>>>>>>>>>>>>>>>>>

>>>>>>>>exon 3>>>>>>>>

T Q G Y A O T T Q A Y G Q Q S Y G T Y G

>>>>>>>>>>>exon 4>>>>>>>>>>>>

>>>>>>>exon 3>>>>>>>>

Q P T D V S Y T Q A Q T T A T Y G Q T A

[illegible]

4

Y A T S Y G O P P T G Y T T P T A P O A

[illegible]

>>>>>>>exon_4>>>>>>>>

Y S Q P V Q G Y G T G A Y D T T T A T V

[illegible]

T T T O A S Y A A O S A Y G T O P A Y P

>>>>>>>>>>>>>>>>>>>> exon 5 >>>>>>>>>>>>>>>>>>>

A Y G O O P A A T A P T R P O D G N K P

>>>>>>>exon 6>>>>>>>

>>>>>>>>>>>>>exon 5>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

T E T S Q P Q S S T G G Y N O P S L G Y

[illegible]

G Q S N Y S Y P Q V P G S Y P M O P V T

[illegible]

[illegible]

1261 AGGAAAAGCCC AAAGGGCGATG CCACAGTGTC CTATGAAGAC CCACCCACTG CCAAGGGCTGC
T G K P K G D A T V S Y E D P P T A K A
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>exon 12>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

[illegible]

1381 GAAGAA GCCT CCAATGAACA GTATGCGGGG TGGTCTGCCA CCCCGTGAGG GCAGAGGCAT
R K K P P M N S M R G L P P R E G R G
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>exon_13>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

```

1441  GCCACCACCA CTCCGTGGAG GTCCAGGAGG CCCAGGAGGT CCTGGGGGGAC CCATGGGTCCG
      M  P  P  P    L  R  G    G  P  G    G  P  G  G    P  G  G    P  M  G
                                     >>>>>>>>>>>>>>>>exon 14>>>>>>>>>>>>>>>>
>>>>>exon 13>>>>>>>

```

[illegible][illegible][illegible]

1681 AAAGCCTGAA GGCTTCCCTCC CGCCACCCCTT TCCGCCCCCCG GGTGGTGATC GTGGCAGAGG
P K P E G F L P P P F P P P G G D R G R
>>>>>>exon 16>>>>>
>>>>>>>>>>exon 15>>>>>>>>>>>>>>>>

6/8

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

2161 gaagaaacat taaaacaagt taaatggtag tgtgcggagt tttttttct tccttcttt
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>exon 17>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

[illegible]

2281 gtggagaacc aagagggcct cttaactgta acaatgttca tggtttgtgat gttttttttt
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>exon 17>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

2341 tttttttaaa ataaaattcc aaatgtttta taaaaaaaaa aaaaaaaaaa
>>>>>>>>>>exon 17>>>>>>>>>>

7/8

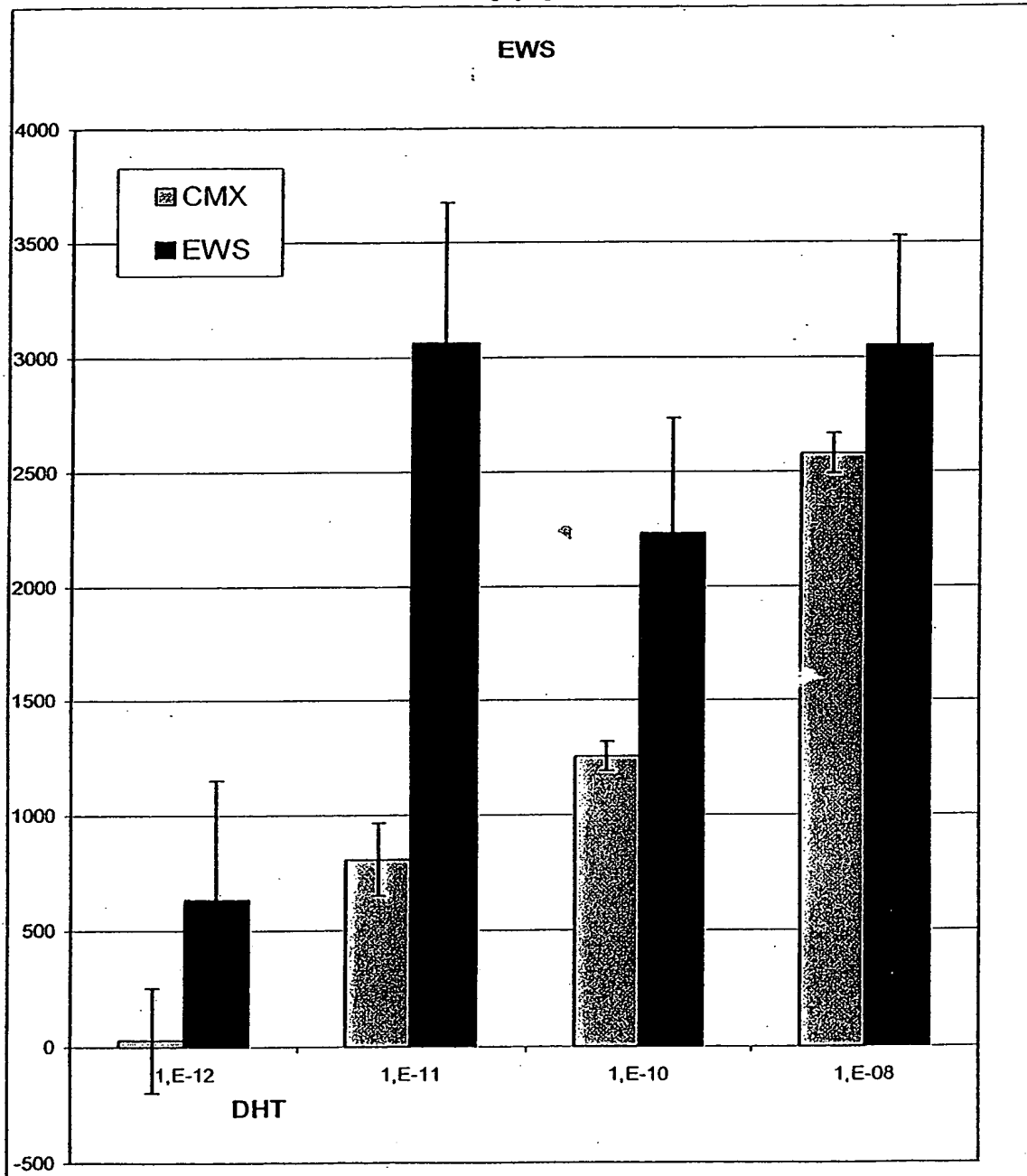
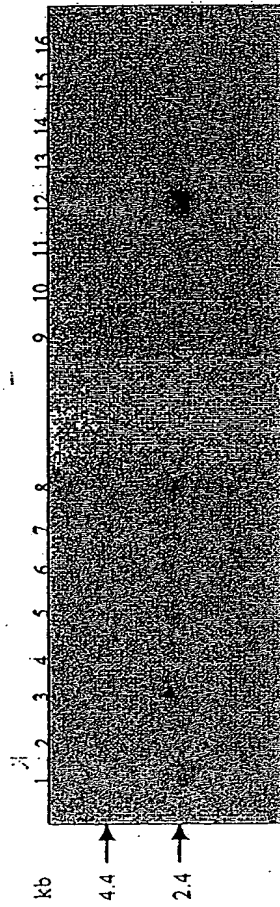


Abbildung 4: Co-Aktivierung des AR-Signals in SH-SY5Y-Zellen.

EWS



- | | |
|---------------|--------------------------|
| 1. Herz | 9. Milz |
| 2. Gehirn | 10. Thymus |
| 3. Plazenta | 11. Prostata |
| 4. Lunge | 12. Hoden |
| 5. Leber | 13. Ovar |
| 6. Sk. Muskel | 14. Dünndarm |
| 7. Niere | 15. Dickdarm |
| 8. Pankreas | 16. Periphere Leukozyten |

Abb. 5a

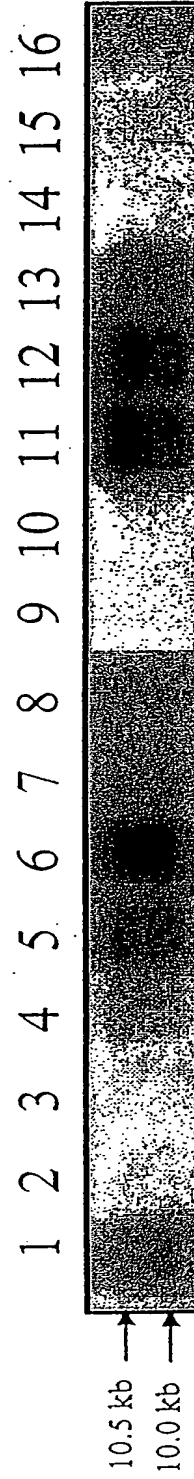


Abb. 5b

Patentanwälte
GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.)

European Patent and Trademark Attorneys

MÜNCHEN – JENA

Büro München / *Munich Offices:*

Perhamerstraße 31 · D-80687 München · Telefon: (089) 5 46 15 20 · Telefax: (089) 5 46 03 92 · e-mail: gefepat.muc@t-online.de

Büro Jena / *Jena Offices:*

Sellierstraße 1 · D-07745 Jena · Telefon: (036 41) 2 91 50 · Telefax: (036 41) 29 15 21 · e-mail: gefepat.jena@t-online.de

5

JENAPHARM GmbH & Co. KG
Anwaltsakte: Pat 3684/11

4. März 2003
H/18/jb(sb)

10

Zusammenfassung

15

20

25

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung des hormonellen Effektes von Substanzen mit den Schritten a) Kontaktieren von EWS (Ewing Sarkom Protein) oder einem EWS Derivat davon mit einem nukleären Rezeptor (NR) oder einem Derivat davon und einer Testsubstanz, und b) Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Bindung von EWS Protein oder dessen Derivat und NR oder dessen Derivat oder c) Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Liganden-induzierte Aktivität des NR. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Bestimmung von Störungen im Co-Modulationsmechanismus zwischen einem Androgenrezeptor und EWS, welche die Messung der zellulären Konzentrationen von Androgenrezeptor und EWS umfasst, sowie die Verwendung von EWS oder Derivaten zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, die sich auf die Aktivität von NR auswirken.